สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบความสามารถของแอนติบอดี clone 12-3F ในการจับกับเททระไซคลินในรูปอิสระ พบว่าแอนติบอดี มีความจำเพาะต่อเททระไซคลินในรูปอิสระ จึงคัดเลือกมาทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดีและทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส และเมื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของแอนติบอดีที่ได้จากการทำ SDS-PAGE พบว่าแอนติบอดีให้แถบของ heavy chain และ light chain ขนาด 62 และ 25 กิโลดาลตัน ตามลำดับ จากนั้นจึงนำมาใช้ในการศึกษาและพัฒนาชุดตรวจเททระไซคลิน ด้วย วิธี ELISA 4 รูปแบบ พบว่าชุดตรวจสอบที่ให้ความไวมากที่สุดคือชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured indirect competitive ELISA โดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 1.13 และ 0.09 ppb ตามลำดับ รองลงมาคือ Ab-captured direct competitive ELISA ให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 2.63 และ 0.19 ppb ตามลำดับ ชุดตรวจสอบแบบ Ag-captured direct competitive ELISA ให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 10.73 และ 2.88 ppb ตามลำดับ และชุดตรวจสอบที่มีความไวน้อยที่สุด คือชุดตรวจสอบแบบ Ag-captured direct competitive ELISA ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ ให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 14.05 และ 4.97 ppb ตามลำดับ

ชุดตรวจสอบชนิด Ab-captured direct competitive ELISA เป็นชุดตรวจสอบที่เลือกมาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ สามารถสร้างกราฟมาตรฐานตรวจเททระไซคลินได้ในช่วงความเข้มข้น 0.25 – 20 ppb โดยใช้เททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA เคลือบหลุมที่ความเข้มข้น 0.125 ppm และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเข้มข้น 0.25 ppm โดยพบว่ามีความไวในการตรวจวัดความเข้มข้นของเททระไซคลินต่ำที่สุดเท่ากับ 0.19 ppb และสามารถตรวจวัดเททระไซคลินได้อย่างถูกต้องที่ความเข้มข้น 0.63 ppb มีความจำเพาะต่อสารกลุ่มเททระไซคลินสูงโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม TC เมื่อทดสอบความแม่นยำของชุดตรวจสอบโดยคำนวณจากค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ intra-variation assay และ inter-variation assay อยู่ในช่วง 1.94-8.35 และ 11.69-18.71 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

ส่วนการศึกษาปัจจัยด้านอื่นๆในการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบนั้น พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มคือ 1.5 ชั่วโมง โดยใช้ blocking solution ที่เหมาะสม คือ นมพร่องมันเนย 5% และมีตัวทำละลายน้ำผึ้งที่เหมาะสม คือ PBST ในอัตราส่วน 10 เท่า ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างเพื่อหาปริมาณที่ตรวจวัดได้ เทียบกับกราฟมาตรฐานแล้วพบว่า % recoveryได้ 91.64-99.39% และ % CV ของ intra และinter-variation assay ได้ 1.94-8.35 และ 12.75-17.94% ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

ในการนำชุดตรวจสอบต้นแบบที่เตรียมได้วัดปริมาณสารเททระไซคลินในตัวอย่างน้ำผึ้งเปรียบเทียบกับเทคนิค LC-MS-MS พบว่าทั้ง 2 วิธีสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณเททระไซคลินได้ถูกต้องใกล้เคียงกัน ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้จากงานวิจัยนี้ จึงสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณเททระไซคลินในตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการนำน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย 9 ชนิด มาทำการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ TC ต้นแบบ พบว่ามีน้ำผึ้ง 2 ยี่ห้อที่ตรวจพบสาร TC เกินกว่าค่า MRL ที่กำหนด ในปริมาณ 49.50 และ 28.78 ppb ตามลำดับ

สิ่งที่ควรทำต่อไปหากจะพัฒนาในเชิงการค้า คือ ศึกษาการเคลือบเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA บนจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม การเตรียมแอนติบอดี เอนไซม์และสับสเตรตที่พร้อมใช้งานได้ทันที นอกจากการทดสอบในน้ำผึ้งแล้ว ควรมีการวิเคราะห์หาสาร TC ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์อื่นๆเพิ่มเติม ตลอดจนศึกษาอายุการใช้งานของชุดตรวจสอบ เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบเททระไซคลินที่สามารถผลิตจำหน่ายได้ในประเทศ ซึ่งช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศต่อไป